植 物 分 类 学 报 36(3):216~221(1998)
Acta Phytotaxonomica Sinica

运用AP-PCR对中国慈姑属内亲缘关系的研究*

杜光伟 易清明
(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)
陈家宽
(复旦大学生物多样性研究所 上海 200433)

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF CHINESE *SAGITTARIA* SPECIES(ALISMATACEAE) BASED ON AP-PCR ANALYSIS

DU Guang-Wei YI Qing-Ming
(*College of Life Sciences, Wuhan University*, Wuhan 430072, China)
CHEN Jia-Kuan
(*Fudan Institute of Biodiversity Science, Fudan University*, Shanghai 200433)

Abstract The arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR) technique was applied to the analysis of the phylogenetic relationships among species of Chinese *Sagittaria* except *S. natans* which is not included in this study. One hundred and twenty-seven polymorphism DNA fragments were generated by ten arbitrarily primers and used to calculate the genetic distance. A phylogenetic dendrogram was constructed based on genetic distance by UPGMA method. The results show that Chinese *Sagittaria* can be divided into three groups, which are composed of seven species and three varieties or forms except *S. natans*. The three groups are: group Ⅰ, with only one species *S. guayanensis*; group Ⅱ, composed of *S. tengtsungensis*, *S. wuyiensis*, *S. lichuanensis* and *Segittaria* sp.; group Ⅲ, *S. potamogetifolia*, *S. pygmaea*, *S. trifolia* var. *trifolia*, *S. trifolia* var. *sinensis*, *S. trifolia* f. *longiloba*. Results of the present study are congruent with those based on morphological and karyotypical ones.

Key words AP-PCR; Chinese *Sagittaria*; Molecular systematics

摘要 用AP-PCR技术测定了中国慈姑属植物基因组DNA的多态性,以其为分子性状用UPGMA方法聚类,结果表明:中国慈姑属植物可分为3大类,包括7种3变种或变型(未包括浮叶慈姑)。本文的结果与基于形态和核型分析的结果一致。

关键词 AP-PCR; 中国慈姑属; 分子系统学

慈姑属 *Sagittaria* L.是泽泻科Alismataceae的一个重要属,为世界性分布,目前已知约为30种。一般认为泽泻科是现存的最古老、最原始的单子叶植物分类群之一。因此,慈姑属的系统学研究对了解单子叶植物的起源具有重要意义。

分类学家们对慈姑属植物的认识已有很长历史。自林奈建立慈姑属起,多位学者对慈姑属作了修定(Rataj,1973,1972; Bogin,1955)。使慈姑属植物的分类大为改观,但同

---

* 国家自然科学基金资助。
1997-02-01收稿,1998-01-07收修改稿。

时也还存在一些有争议的问题，如有的学者认为慈姑属应当分为慈姑亚属和冠果草亚属(陈家宽，1989；Rataj，1973，1972；Bogin，1955)，或在属下不设亚属(孙祥钟，1992；Chafoor，1974)；另外一些学者则认为应设慈姑属和冠果草属(Cook，1990；Small，1909)。至于中国的慈姑属植物，直到 1952 年才开始有人整理，后经多年研究，渐至完善(颜素珠，1993；孙祥钟，1992；陈家宽，1989；裴鉴，单人骅，1952)，但在中国慈姑属的分类问题上，同样存在不尽相同的意见。

近几年来，由 Williams 和 Welsh 创立的使用随机引物的 PCR，RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)(Williams，1990)或 AP-PCR(Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction)(Welsh，1990)广泛应用于基因定位、基因克隆、物种分类及进化研究、作物育种、遗传资源评估、生物防治等各个方面。这两种技术在本质上没有什么区别，只是 RAPD 一般使用 10 nt 的引物，而 AP-PCR 使用的引物长度一般为 20～30 nt。本研究同时使用了长度为 10 nt 和 20 nt 左右的引物，用 PCR 产生的 DNA 分子标记作为性状来研究中国慈姑属植物的亲缘关系。

1　材料和方法

1.1　材料

本研究所用材料见表 1.

表 1　材料来源

Table 1　Origin of the materials used in this study

编号 Number	分类群 Taxa	来源 Origin	凭证标本 Voucher
1	长喙毛茛泽泻 *Ranalisma rostrata* Stapf.	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W003
2	腾冲慈姑 *Sagittaria tengtsungensis* H. Li	Tengchong, Yunnan(云南腾冲)	Q. F. Wang(王青锋)W070
3	冠果草 *S. guayanensis* ssp. *lappula* (D. Don)Bogin	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W002
4	武夷慈姑 *S. wuyiensis* J K Chen *et al*.	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W13
5	未定种 *Sagittaria* sp.	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	J. K. Chen(陈家宽)94071
6	利川慈姑 *S. lichuanensis* J K Chen *et al*.	Lichuan, Hubei(湖北利川)	J. K. Chen(陈家宽)0123a
7	小慈姑 *S. potamogetifolia* Merr.	Dongxiang, Jiangxi(江西东乡)	Q. F. Wang(王青锋)W011
8	矮慈姑 *S. pygmaea* Miq.	Wuhan, Hubei(湖北武汉)	Q. F. Wang(王青锋)0043
9	慈姑 *S. trifolia* var. *trifolia*	Wuhan, Hubei(湖北武汉)	J. K. Chen(陈家宽)0012
10	长瓣慈姑 *S. trifolia* f. *longiloba* (Turr.)Makino	Wuhan, Hubei(湖北武汉)	J. K. Chen(陈家宽)0002
11	华夏慈姑 *S. trifolia* var. *sinensis* (Sims)Makino	Nanning, Guangxi(广西南宁)	J. K. Chen(陈家宽)栽培

1.2 引物

从中国科学院上海细胞生物学研究所获得,引物序列见表2。

1.3 DNA的分离

从植株上取新鲜叶片,按Hu的方法(Hu & Quios,1991)提取DNA。

1.4 DNA扩增和数据分析

按我们以前报道的方法进行(Yi *et al.*,1995)。

表2 用于PCR扩增慈姑DNA的引物

Table 2 Primers used for PCR amplification of *Sagittaria* DNA

编号* primer number	序列 Sequence (5′-3′)
1	5′CGGCGGCAGGTCCACGGTC3′
2	5′CCTGATGCCCACGTCGTAGC3′
3	5′CTGTAGCGGTCCCGTTGCTGCGGTG3′
4	5′AACTCGGTCGTCCCCACTGTCGTC3′
5	5′GCCGGATTATTCATACCGTAC3′
6	5′CGACAAGCTTCATCGTGTCGG3′
7	5′GAAACGGGTG3′
8	5′GTTTCGCTCC3′
9	5′GACGGATCAG3′
10	5′ACGGATCCTG3′

* 编号同表1.
For the numbers listed, see Table 1.

2 结果和讨论

表3 中国慈姑属植物之间的遗传距离矩阵

Table 3 Matrix of genetic distance measures among species of Chinese *Sagittaria* estimated from amplified fragments data

编号* material number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0										
2	0.50	0									
3	0.58	0.48	0								
4	0.56	0.36	0.46	0							
5	0.57	0.41	0.46	0.15	0						
6	0.51	0.43	0.49	0.25	0.21	0					
7	0.56	0.47	0.46	0.44	0.42	0.37	0				
8	0.57	0.44	0.55	0.47	0.49	0.45	0.43	0			
9	0.60	0.40	0.47	0.46	0.47	0.43	0.33	0.35	0		
10	0.57	0.42	0.48	0.44	0.46	0.44	0.33	0.36	0.03	0	
11	0.56	0.47	0.53	0.42	0.44	0.44	0.33	0.42	0.16	0.14	0

* 编号同表1.
For the numbers listed, see Table 1.

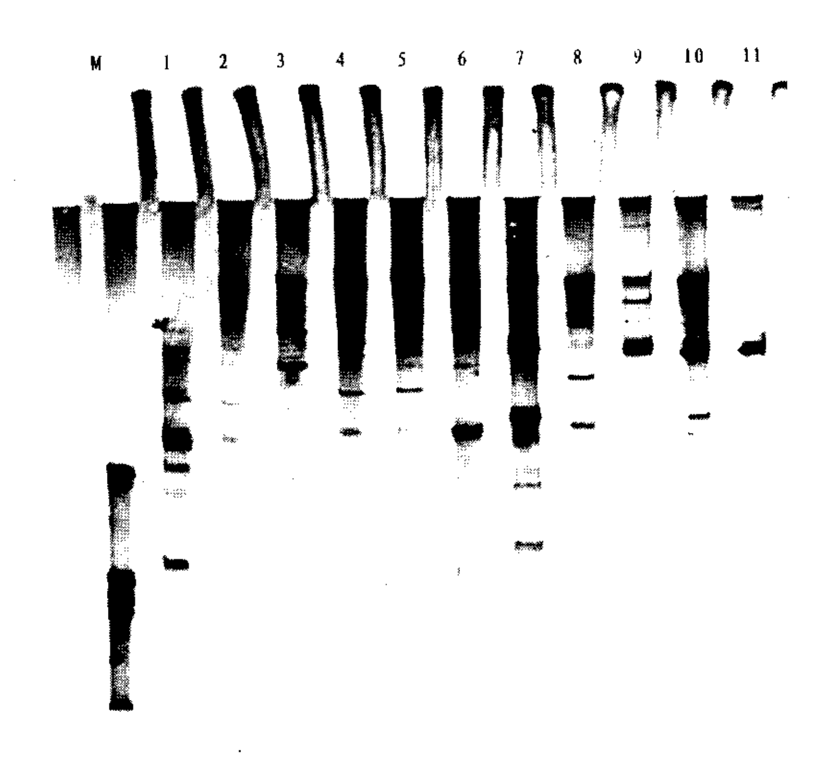


图1　中国慈姑属和长喙毛茛泽泻的 AP－PCR 扩增产物电泳图谱。引物为 C15。
Fig.1　AP－PCR amplification of Chinese *Sagittaria* and *Ranalisma* using C15 as primer.
M: Molecule weight marker, pGEM－7Z(＋)/HaeIII. The numbers are same as those in the Table 1.

2.1　中国慈姑属植物的分类

我们用10个引物，通过 PCR，对中国慈姑属植物及其近缘种长喙毛茛泽泻的基因组 DNA 进行扩增，将扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，共获得127个多态性 DNA 片段(图1，图2)。胶上某一位置的 DNA 带记为"1"，同一位置未出现 DNA 带则记为"0"，据此计算遗传距离表(表3)，利用 UPGMA 法构建聚类图(图1)。从聚类图(图1)可看出，长喙毛茛泽泻由于与慈姑属为不同属而单独成为一类。中国慈姑属植物可划分为3大类：Ⅰ类为冠果草一种，与所有其他慈姑属植物相似性较小，该种是整个慈姑属已知分类群中最为原始的植物；Ⅱ类包括腾冲慈姑、武夷慈姑、利川慈姑3个种及未鉴定的 *Sagittatia* sp.，这一类为Ⅰ类和Ⅲ类之间的过渡类型；Ⅲ类包括了小慈姑、矮慈姑、慈姑、华夏慈姑、长瓣慈姑。根据图1所划的结合线 l_1，可将武夷慈姑与利川慈姑划为一个种，但考虑以下事实，我们认为将武夷慈姑作为一独立的种更合适，即：(A) 虽然武夷慈姑与利川慈姑之间的遗传距离较小，仅为0.25，但其与慈姑属中其余各典型种之间的平均遗传距离为0.44，这等于慈姑属植物各已知种之间的平均遗传距离。也就是说，与中国慈姑属内其他各种相比，武夷慈姑在基因组结构的差异达到了种级水平。还应看到武夷慈姑与腾冲慈姑之间的遗传距离也只有0.36，说明武夷慈姑与利川慈姑、腾冲慈姑在系统发育上有较近的亲缘关系。(B) 武夷慈姑与利川慈姑的核型不同，后者第一对染色体的中部着丝点不配对。(C) 武夷慈姑与利川慈姑的繁育系统也有差异，前者兼具有性生殖和无

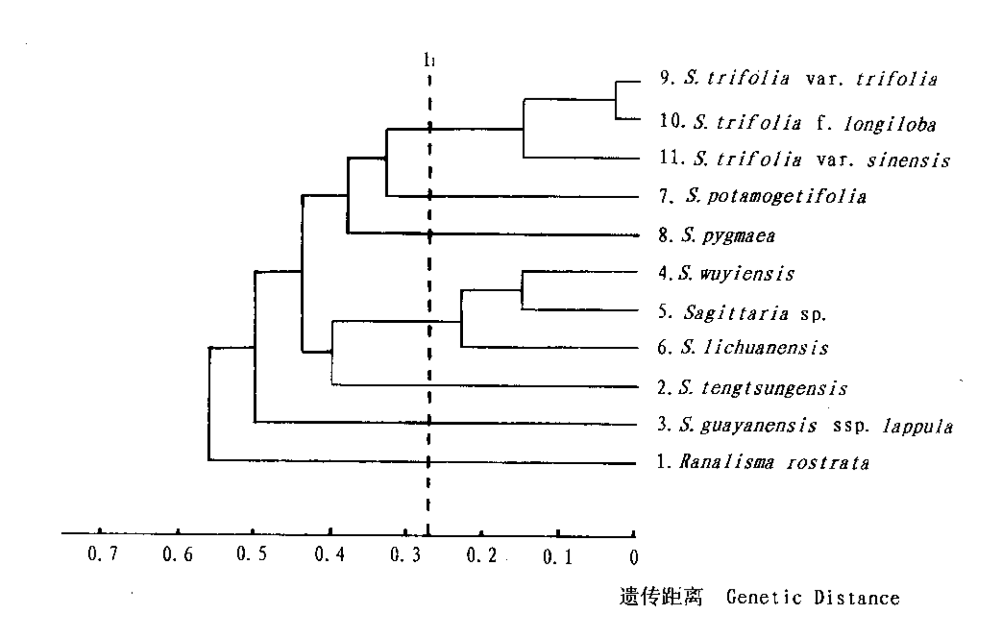


图2 基于分子标记分析的中国慈姑属植物的聚类图
Fig.2 A dendrogram demonstrating the relationships among species of Chinese *Sagittaria* based on genetic distances between species.

性生殖,后者仅有无性生殖。(D)两者在地理分布上有间断,武夷慈姑分布于武夷山附近,利川慈姑仅分布于湖北利川。另外,慈姑与华夏慈姑和长瓣慈姑之间的平均遗传距离很小,仅为0.11,因此将华夏慈姑和长瓣慈姑视为慈姑的变种及变型是合理的。考虑到未鉴定过的 *Sagittaria* sp.与武夷慈姑之间的遗传距离较小,只有0.15,可将其作为武夷慈姑的一个变型。Bogin(1955)和 Rataj(1972)等认为小慈姑为 *S. pygmaea* 和 *S. trifolia* 杂交产物,我们的结果不支持这一观点。相反,我们认为小慈姑是一个独立的种,因为它与慈姑属植物各已知种之间的平均遗传距离为0.41,此值还大于慈姑与慈姑属植物各已知种之间的平均遗传距离0.40。综上所述,DNA水平上的分子证据表明,除本研究中因故未取样的浮叶慈姑外,中国慈姑属植物包括7个种(冠果草,腾冲慈姑,利川慈姑,武夷慈姑,小慈姑,矮慈姑,慈姑)3个变种或变型(华夏慈姑,长瓣慈姑和 *Sagittaria* sp.)。这一结论与陈家宽(1989)根据形态特征和核型分析所得的分类结果一致。

参 考 文 献

孙祥钟,1992. 中国植物志.第8卷.北京:科学出版社
陈家宽,1989. 中国慈姑属的系统与进化植物学研究. 武汉:武汉大学出版社
钟扬,陈家宽,邹洪才,1992. 中国慈姑属系统发育的研究. 武汉植物学研究, 10(3):243~248
钟扬,陈家宽,黄德世,1990. 数量分类的方法与程序. 武汉:武汉大学出版社
裴鉴,单人骅,1995. 华东水生维管束植物. 北京:中国科学院
颜素珠,1983. 中国水生植物图说. 北京:科学出版社
戴灼华,刘凤丽,1994. *Drosophila auraria* 复合种的进化遗传学研究——分支分析与数值分析(下). 遗

传学报, 21(6): 436～440
Bogin C, 1955. Revision of the genus *Sagittaria* (Alismataceae). Mem N Y Bot Gard, 9(2):179～233
Chafoor A, 1974. Alismataceae. In: Fl W Park, 68:1～12
Cook C D K, 1990. Aquatic Plant Book. The Haque: SPB Academic Publishing
Hu J, Quiros C F, 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Rep, 10: 505～511
Rataj K, 1972. Revision of the genus *Sagittaria* Ⅰ. Old world species. Annot Zool Bol, 76:1～31
Rataj K, 1973. Revision of the genus *Sagittaria* Ⅱ. The species of West Indias, Central and South America. Annot Zool Bol, 78: 1～61
Small J K, 1909. Alimaceae N Am Flora. 17(1): 48～62
Welsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. Nuclei Acids Res, 18: 7213～7218
Williams J G K, Kubelik A E, Levar K J *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 18:6531～6535
Yi Q M, Deng W G, Xia Z P *et al.* , 1995. Polymorphism and genetic relatedness among wild and cultivated rice species determined by AP-PCR analysis. Hereditas, 122: 135～141